

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

Biotekniikka

2015

Mikael Jaakkola

ENTEROVIRUSTEN TYYPITYS RT-QPCR-MENETELMÄLLÄ



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma | Biotekniikka

Toukokuu 2015 | Sivumäärä 26

Ohjaajat: Petri Susi (FT), Jarno Pusa (Biot. ins.)

Mikael Jaakkola

ENTEROVIRUSTEN TYYPITYS RT-QPCR-MENETELMÄLLÄ

Työn tarkoituksena oli optimoida toimiva ja herkkä RT-qPCR-menetelmä enterovirusten tyypittämiseksi monistamalla enterovirusgenomin VP1-aluetta. Optimoinnissa käytettiin näytteinä plasmidiin kloonattuja virusgenomeja ja virus-RNA:ta, jotka oli eristetty tunnetuista virustyypeistä.

Tutkimuksessa testattiin eri valmistajien kaupallisia qPCR-reaktiosarjoja, joiden herkkyyttä ja toimivuutta testattiin sekä perinteisellä PCR- että qPCR-laitteella. RT-qPCR-menetelmään siirryttäessä testattiin myös eri valmistajien RT-entsyymien herkkyyttä. Reaktiosarjojen herkkyys määritettiin Cp-arvojen perusteella ja tarkistamalla tuotteet agarosigeelielektroforeesilla (AGE). Kehitettyä optimaalista RT-qPCR-menetelmää verrattiin erittäin herkkään diagnostiseen ENRI-menetelmään. Optimoidun menetelmän toimivuus testattiin tuntemattomia enterovirus-RNA-näytteitä käyttäen.

Tutkimuksessa havaittiin merkittäviä eroja eri valmistajien qPCR-reaktiosarjojen välillä ja löydettiin selkeästi parhaiten toimiva reaktiosarja, joka tuotti 100 kopion herkkyyden, kun näytteenä käytettiin virus-plasmidia.. Tuntemattomista näytteistä tällä menetelmällä monistettiin VP1-alue 9/19 (47 %) tuntemattomasta enterovirusnäytteestä.

ASIASANAT:

enterovirus, käänteistranskriptioreaktio, VP1-geeni, virustyyppitys, polymeerasiketjureaktio

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food technology | Biotechnology

May 2015 | Total number of pages 26

Instructor: Petri Susi (PhD), Jarno Pusa (Eng. in Biotech.)

Mikael Jaakkola

TYPING OF ENTEROVIRUSES WITH THE RT-QPCR METHOD

The purpose of this study was to optimize the functional and sensitive RT-qPCR method for enterovirus typing by multiplying the VP1 region of the enterovirus genome. In the optimization, viral genomes cloned into plasmid and viral RNA isolated from known viral types were used as samples.

In this research commercial qPCR kits by various manufacturers were tested for sensitivity and functionality with both conventional PCR and qPCR instruments. In the case of the RT-qPCR method, the sensitivity of RT enzymes from different manufacturers was also tested.

The qPCR kit sensitivity was determined on the basis of the Cp values as well as by checking the products by agarose gel electrophoresis (AGE). The developed optimal RT-qPCR method was compared with the highly sensitive diagnostic ENRI method. The functionality of the optimized method was tested with unknown enterovirus RNA samples.

The study found significant differences between different manufacturers' qPCR kits and determined the most effective kit which exhibited a sensitivity of 100 copies when the viral plasmid was used as sample. With this method the VP1 region 9/19 (47 %) of unknown enterovirus samples was amplified.

KEYWORDS:

enterovirus, reverse transcription, VP1 region, virus typing, polymerase chain reaction

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO	6
1 JOHDANTO	7
2 IHMISEN ENTEROVIRUKSET	8
2.1 Enterovirusten rakenne	8
3 TUTKIMUSMENETELMÄT	10
3.1 RT-qPCR-menetelmä	10
3.2 Roche LightCycler 480 -laite	10
3.3 Agaroosigeelielektroforeesi (AGE)	11
4 REAGENSIT	12
4.1 Alukkeet	12
4.2 qPCR-reaktiosarjat	12
4.3 RT-entsyymit	13
4.4 Näytteet	13
5 TYÖN SUORITUS JA TULOKSET	14
6 POHDINTA	25
LÄHTEET	26

KUVAT

Kuva 1. Enterovirusten rakenne. © ViralZone 2008 Swiss Institute of Bioinformatics. ⁶	9
Kuva 2. Enteroviruksen genomikaavio.	9
Kuva 3. Alukkeiden sijoittuminen enterovirusten genomissa.	12
Kuva 4. PCR-gradienttitest.	16
Kuva 5. Alukelaimennostesti.	18
Kuva 6. RT-entsyymin määrää mittaava testi.	20
Kuva 7. RT-qPCR-herkkyystesti.	23
Kuva 8. RNA-näytteiden sulamispisteet.	24

KUVIOT

Kuvio 1. qPCR-testi pCV-A9-virusplasmidilla.	17
Kuvio 2. RT-entsyymien rinnakkaistesti.	19
Kuvio 3. RT-entsyymin määrää mittaava testi.	21
Kuvio 4. RT-qPCR-herkkyystesti.	23

TAULUKOT

Taulukko 1. Käytetyt qPCR-reaktiosarjat.	12
Taulukko 2. Työssä testatut RT-entsyymit.	13
Taulukko 3. Käytetyt virusplasmidit ja virus-RNA:t.	13
Taulukko 4. PCR-reaktioseos.	14
Taulukko 5. PCR-ajo-ohjelma.	15
Taulukko 6. RT-reaktioseos.	18
Taulukko 7. PCR-reaktioseos.	19
Taulukko 8. ENRI RT -reaktioseos.	22
Taulukko 9. ENRI PCR -reaktioseos.	22

KÄYTETYT LYHENTEET JA SANASTO

Lyhenne	Lyhenteen selitys
PCR	Polymeraasiketjureaktio (engl. polymerase chain reaction)
RT-qPCR	Reaaliaikainen kvantitatiivinen käänteistranskriptiopolymeraasiketjureaktio (engl. real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction)
Semi-nested PCR	PCR-menetelmä, jolla monistetaan kohdesekvenssi käyttämällä kahta peräkkäistä PCR-ajoa.
Melting point (T _m)	Jokaiselle DNA:lle ominainen sulamispiste.
RT-entsyymi	Käänteiskopioijaentsyymi (engl. reverse transcriptase)
cDNA	Komplementaarinen DNA (engl. complementary DNA)
C _p -arvo	Ilmaisee PCR-syklin, jonka aikana näytteen fluoresenssi ylittää kynnysarvon.
σ	Keskihajonta

1 JOHDANTO

Opinnäytetyö tehtiin Turun ammattikorkeakoulu Oy:n tiloissa toimivassa Biomaterials & Diagnostics -tutkimusryhmässä. Työn tarkoituksena oli kehittää toimiva ja herkkä RT-qPCR-menetelmä enterovirusten VP1-geenialueen monistamiseksi. Työssä käytettiin koettimia, jotka on kuvailtu aiemmin¹ menetelmässä, jossa enterovirusten VP1-geenialuetta monistettiin ns. semi-nested PCR -menetelmällä. Semi-nested PCR -menetelmä ei kuitenkaan ole suuren kontaminaatoriskin takia käytettävissä diagnostiikassa, joten suljetun menetelmän kehitykselle on selkeä tarve.

Opinnäytetyössä testattiin plasmidimuotoon kloonatuilla virusgenomeilla (myöhemmin näistä käytetään termiä: virus-plasmidi) erilaisten qPCR-reaktiosarjojen toimivuutta alukkeiden erilaisissa kiinnittymislämpötiloissa (engl. annealing temperature) ja reaktiosarjojen herkkyyttä. Työn myöhemmissä vaiheissa käytettiin tunnetuista virustyypeistä eristettyjä virus-RNA-paloja, kun testattiin eri RT-entsyymien herkkyyttä ja toimivuutta.

Optimoidun menetelmän herkkyyttä verrattiin ENRI-menetelmään², joka on erittäin herkkä virusdiagnostinen menetelmä.

Tavoitteena oli luoda menetelmä, jolla voidaan suoraviivaisesti RT-qPCR-menetelmää hyödyntäen tyypittää mahdollisimman monta erilaista enterovirusta. Toimivaa menetelmää voidaan hyödyntää epidemiologisissa tutkimuksissa.

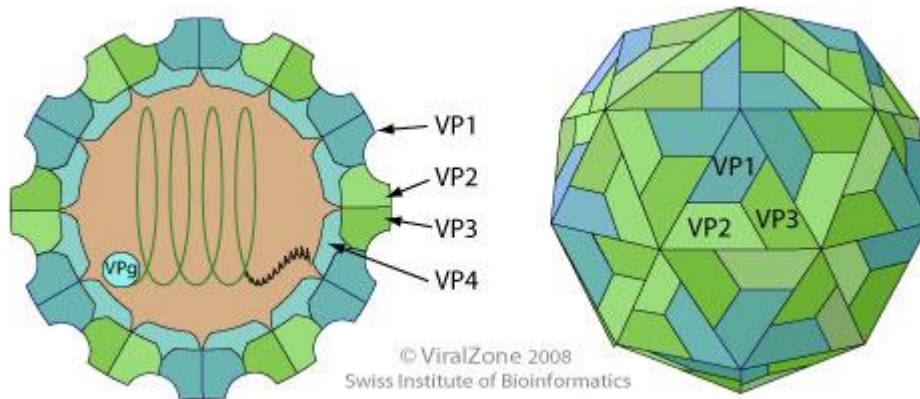
2 IHMISEN ENTEROVIRUKSET

Pikornavirukset (*Picornaviridae*-heimo) jakautuvat 29 virussukuun: *Aphthovirus*, *Aquamavirus*, *Avihepatovirus*, *Avisivirus*, *Cardiovirus*, *Cosavirus*, *Dicipivirus*, *Enterovirus*, *Erbovirus*, *Gallivirus*, *Hepatovirus*, *Hunnivirus*, *Kobuvirus*, *Kunsagivirus*, *Megrivirus*, *Mischivirus*, *Mosavirus*, *Oscivirus*, *Parechovirus*, *Pasivirus*, *Passerivirus*, *Rosavirus*, *Sakobuvirus*, *Salivirus*, *Sapelovirus*, *Senecavirus*, *Siccinivirus*, *Teschovirus* ja *Tremovirus*. *Enterovirus*-suku jaetaan edelleen lajeihin: *Enterovirus* A-H ja J sekä *Rhinovirus* A-C.³

Enterovirukset ovat yleisimpiä viruksia ihmisten taudinaiheuttajina. Useimmat niiden aiheuttamista infektiosta ovat oireettomia tai aiheuttavat vain lievää kuumetautia tai ylähengitysteiden oireita. Enterovirukset on kirjattu yleisimmäksi viruspatogeeniksi, joka voi aiheuttaa muun muassa aivokalvontulehdusta sekä poliomyeliittiä.^{1,4} Enterovirusten osallisuutta lapsuusiän diabeteksen puhkeamiseen on tutkittu myös pitkään.⁵

2.1 Enterovirusten rakenne

Enterovirukset ovat vaipattomia, pallomaisia, halkaisijaltaan noin 30 nm kokoisia RNA-viruksia. RNA-genomia suojaa ikosahedraalinen proteiinikuori (kapsidi). Kapsidi koostuu tiheästi pakatuista 60 protomeerista, joista jokainen koostuu neljästä polypeptidistä VP1, VP2, VP3 ja VP4. VP1-3 sijaitsevat kapsidin pinnalla ja VP4 kapsidin sisäpuolella (Kuva 1).⁶



Kuva 1. Enterovirusten rakenne. © ViralZone 2008 Swiss Institute of Bioinformatics.⁶

Enterovirusten yksijuosteisen RNA-genomin (engl. single-stranded RNA, ssRNA) pituus on noin 7200-8500 emäsparia. RNA on positiivissäikeinen, eli viruksen yksijuosteinen RNA pystyy toimimaan lähetti-RNA:n (engl. messenger RNA, mRNA) tavoin proteiinisynteesissä. Genomin 5'- ja 3'-päissä on transloimaton alue (engl. untranslated region, UTR). VP1-4-geenit sijaitsevat genomin 5'-päässä (Kuva 2) Näistä enterovirusten tyypityksen kannalta tärkein on VP1-alue.^{6,7}



Kuva 2. Enteroviruksen genomikaavio.

3 TUTKIMUSMENETELMÄT

3.1 RT-qPCR-menetelmä

RT-qPCR tarkoittaa reaaliaikaista kvantitatiivista käänteistranskriptiopolymeraasiketjureaktiota.⁸ Menetelmä jakautuu kahteen osaan. Käänteiskopiointireaktiossa eli RT-reaktiossa yksijuosteisesta RNA:sta muodostetaan käänteiskopioijaentsyymien ja spesifisen alkupään (3'-pään) alukkeen avulla kaksijuosteinen komplementaarinen DNA eli cDNA, jossa RNA:n parina on yksijuosteinen DNA-nauha.^{9,10} PCR-reaktiossa cDNA:ta monistetaan spesifisten alku- ja loppupään alukkeiden avulla. Tässä työssä on käytetty kaksivaiheista RT-qPCR-menetelmää eli RT- ja PCR-reaktiot tehtiin erikseen eri putkissa. Menetelmä voidaan myös toteuttaa yksivaiheisena, jolloin reaktiot tapahtuvat peräkkäin samassa putkessa.¹¹

3.2 Roche LightCycler 480 -laite

Työssä käytettiin Roche LightCycler 480 -PCR-laitetta. Useimmista RT-PCR-laitteista poiketen LightCycler 480 -laitteessa ei käytetä PCR-reaktioputkia vaan 96-kuoppalevyä. Tällöin se sopii erityisen hyvin epidemiologisten näytteen analysointiin, jolloin näytteitä analysoidaan kerralla iso määrä.

Tässä laitteessa signaalin muodostus perustuu fluoresoivaan SYBR Green -väriaineeseen, joka sitoutuu kaksijuosteiseen DNA:han. DNA:n määrä kasvaa jokaisen PCR-syklin jälkeen, jolloin myös SYBR Greeniä sitoutuu enemmän ja fluoresenssi kasvaa. Näytöltä voidaan seurata reaaliajassa tuotteen muodostumista kussakin kuopassa.^{12,13}

Kone antaa tuloksena Cp-arvoja, jotka kertovat, kuinka aikaisessa vaiheessa tuotetta on alkanut muodostua eli missä vaiheessa näytteen fluoresenssi ylittää asetetun kynnsarvon (engl. cycle threshold) eli alimman fluoresenssitason, jossa tuotteesta syntynyttä signaalia on havaittavissa.¹⁴ Cp-arvo ja kopioluku

voidaan suhteuttaa toisiinsa vertaamalla 10-kertaisen kopioluvun muutoksen vastaavuutta Cp-arvojen yksiköissä. Mitä alhaisempi Cp-arvo on, sitä aikaisemmin on alkanut muodostua tuotetta ja sitä enemmän lähtömateriaalissa on monistettavaa nukleinihappoa.

Monistunut tuote tunnistetaan sulamispisteanalyysin (engl. melting curve analysis) avulla, jossa selvitetään jokaiselle DNA:lle ominainen sulamispiste (T_m) (engl. melting point).^{12,13}

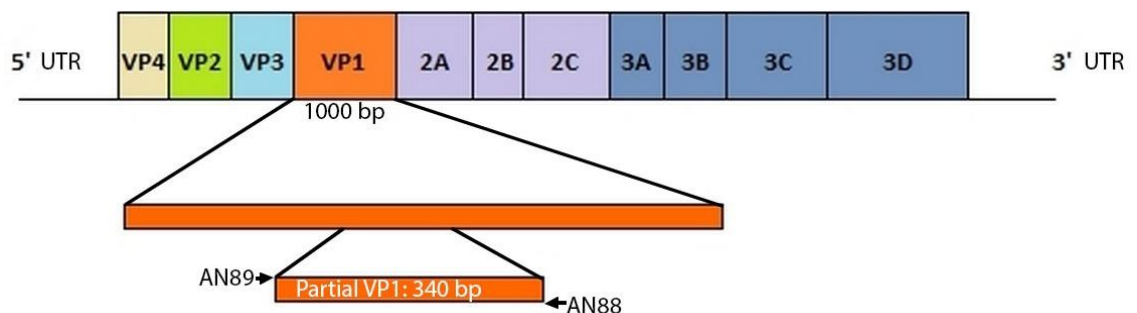
3.3 Agaroosigeelielektroforeesi (AGE)

RT-qPCR-tuotteet ajettiin myös agaroosigeelille, koska tuotteen tunnistaminen perustuu RT-PCR-menetelmissä värin sitoutumiseen kaksinauhaiseen nukleinihappoon, jolloin myös ns. väärät positiivisetkin voivat tuottaa signaalia. Geelillä saattaa myös näkyä tuotetta laimennoksessa, joka ei saa Cp-arvoja tai muodosta fluoresenssikäyrää.

4 REAGENSIT

4.1 Alukkeet

Työssä käytettiin AN89- ja AN88-alukkeita.¹ Kontrollina käytettiin CV-A9-virukselle spesifistä Partial CV-A9-aluketta. Niitä käyttämällä voidaan perinteisessä PCR-reaktiossa monistaa noin 340 emäsparin pituista VP1-geenialuetta (Kuva 3).¹



Kuva 3. Alukkeiden sijoittuminen enterovirusten genomissa.

4.2 qPCR-reaktiosarjat

Työssä vertailtiin eri valmistajien qPCR-reaktiosarjoja tarkastelemalla niiden toimivuutta ja herkkyyttä (Taulukko 1).

Taulukko 1. Käytetyt qPCR-reaktiosarjat.

Valmistaja	qPCR-reaktiosarjan kauppanimi
KAPA Biosystems	KAPA SYBR FAST Universal qPCR kit
Bioline	SensiFAST Sybr NO-ROX-kit
Fermentas	Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix
Agilent Technologies	Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green qPCR Master Mix

4.3 RT-entsyymit

Työssä vertailtiin eri valmistajien RT-entsyymejä tarkastelemalla niiden herkyyttä eli kykyä muodostaa cDNA-tuotetta – tämä näkyi PCR-lopputuotteena 2-vaiheisessa RT-PCR-reaktiossa. RT-entsyymit ovat esitetty taulukossa 2.

Taulukko 2. Työssä testatut RT-entsyymit.

Valmistaja	RT-entsyymin kaupp nimi
Bioline	SensiFAST Reverse Transcriptase cDNA synthesis kit
Promega	ImProm II Reverse Transcriptase
Fermentas	RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase
Agilent Technologies	AffinityScript Multiple Temperature Reverse Transcriptase
Invitrogen	SuperScript III Reverse Transcriptase
Invitrogen	SuperScript IV Reverse Transcriptase

4.4 Näytteet

Työssä käytettiin taulukossa 3 esitettyjä enterovirus-plasmideja ja virus-RNA:ta.

Taulukko 3. Käytetyt virusplasmidit ja virus-RNA:t.

Plasmidi	Virus-RNA	Tyypinimi	Laji
pCV-B3	-	coxsackievirus B3	<i>Enterovirus B</i>
pCV-B4	CV-B4	coxsackievirus B4	<i>Enterovirus B</i>
pCV-A9	CV-A9	coxsackievirus A9	<i>Enterovirus B</i>
pCV-A16	CV-A16	coxsackievirus A16	<i>Enterovirus A</i>
pCV-A21	-	coxsackievirus A21	<i>Enterovirus C</i>
pE-1	-	echovirus 1	<i>Enterovirus B</i>
pE-7	E-7	echovirus 7	<i>Enterovirus B</i>
pE-11	E-11	echovirus 11	<i>Enterovirus B</i>

5 TYÖN SUORITUS JA TULOKSET

Virusplasmideista valmistettiin laimennossarjat 10^6 - 10^{-1} (yksikkönä kopioluku / μ l). Tätä varten virus-plasmidien DNA-pitoisuus (μ g / μ l) määritettiin NanoDrop 1000 -laitteella. DNA-pitoisuuksista laskettiin genomiekvivalenttiarvot, joista pystyttiin laskemaan käyttöläimennos (10^8 kopiota / μ l).

PCR-reaktioseoksen koostumus on esitetty taulukossa 4.

Taulukko 4. PCR-reaktioseos.

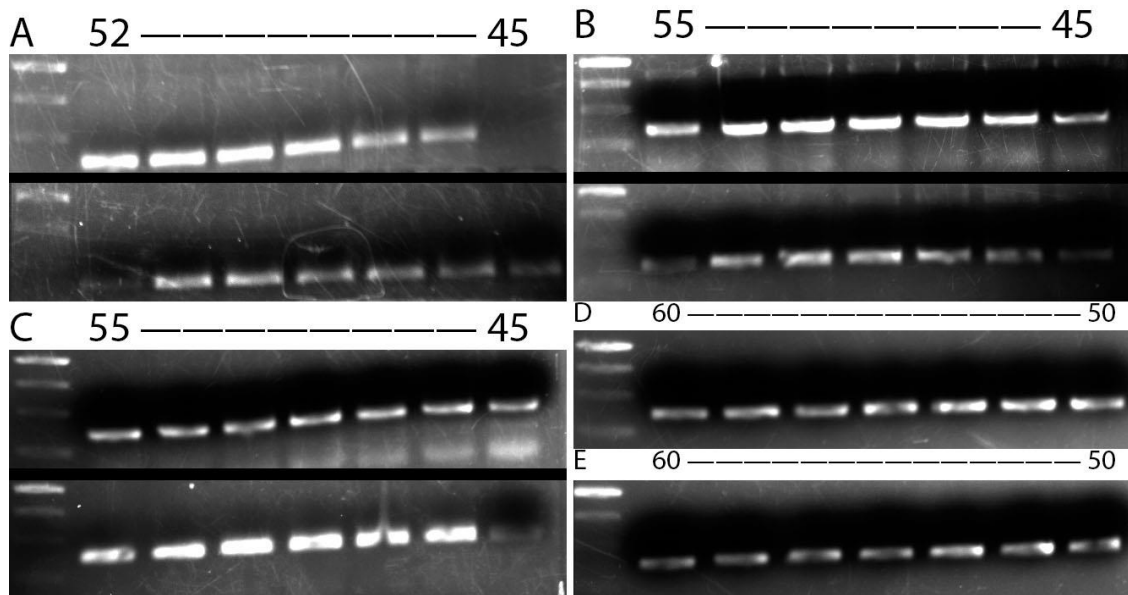
Reagenssi	Määrä (μ l) (loppukonsentraatio)
H ₂ O	7
AN88	1 (500 nM)
AN89	1 (500 nM)
qPCR-reaktiosarja	10 (1X)
Virus-plasmidi	1
Kokonaistilavuus	20

Aluksi optimoitiin alukkeiden kiinnittymislämpötila (PCR-gradientt testi) käyttäen Taulukossa 4 esitettyä reaktioseosta ja taulukossa 5 esitettyä PCR-ajo-ohjelmaa. Työ tehtiin käyttäen perinteistä PCR-laitetta (Bio-Rad C1000) ja pCV-A9-plasmidia 10^6 -laimennoksella. Testissä verrattiin AN88- ja AN89-alukkeita CV-A9 Partial -alukkeisiin lämpötila-alueella 52-62 °C. Tällä tavalla saatiin nopeasti selville, millä kiinnittymislämpötilalla pCV-A9 plasmidin monistuminen on tehokkainta. Tätä tietoa käytettiin jatkossa muiden virusplasmidien testaamiseen vastaavalla tavalla (PCR-gradientti välillä 45-62 °C). Tämän lisäksi vertailtiin kahden qPCR-reaktiosarjan (KAPA ja SensiFAST) toimivuutta perinteisessä PCR-ympäristössä Bio-Rad C1000 -PCR-laitteella. Tulokset on esitetty kuvassa 4.

Taulukko 5. PCR-ajo-ohjelma.

Vaihe	Lämpötila (°C)	Aika	Syklit
PCR-entsyymin aktivointi (Hold)	95	3 min	x1
Denaturaatio (Denaturation)	95	10 s	x 45
Kiinnittyminen (Annealing)	45-62	30 s	
Pidennys (Extension)	72	30 s	
Nauhan pidennys (Final Chain Elongation)	72	5 min	x1

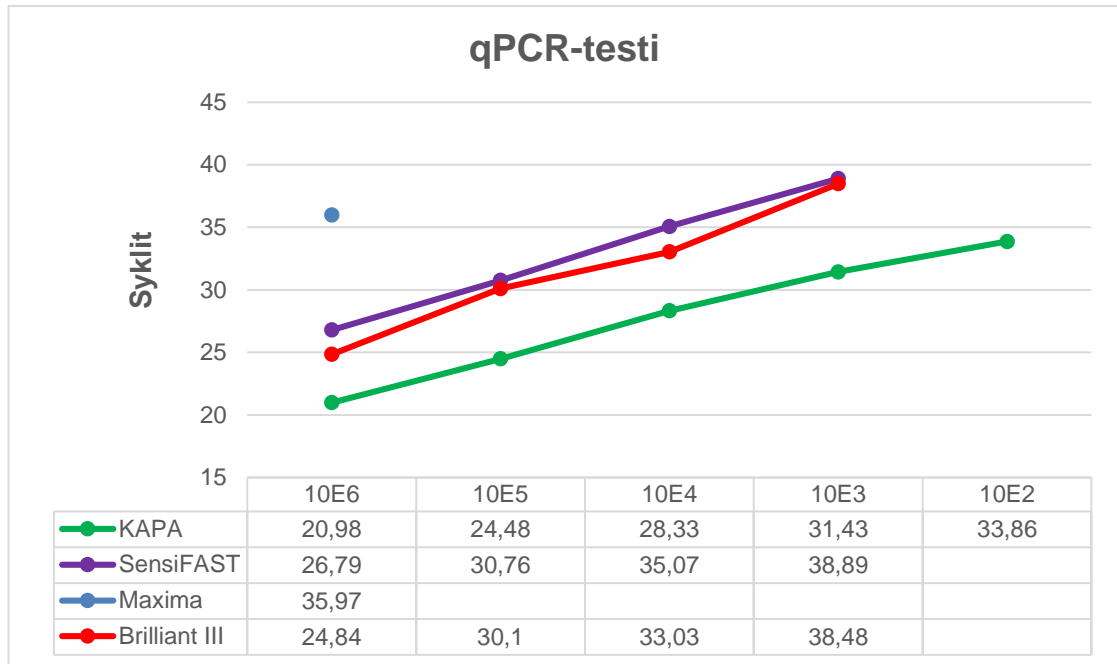
Työssä testattiin kahdeksan eri virus-plasmidin (pCV-A9, pCV-A16, pCV-A21, pCV-B3, pCV-B4, pE-1, pE-7 ja pE-11) VP1-geenin monistamista alukkeiden eri kiinnittymislämpötiloissa käyttäen PCR-laitteen gradienttiominaisuutta. Testit osoittivat optimaalisen alukkeiden kiinnittymislämpötilan olevan välillä 52–55 °C. Lämpötila 52 °C valittiin käytettäväksi jatkoanalyysseissa. Käytetyt qPCR-reaktiosarjat monistivat 340 bp tuotetta kuudesta eri plasmidista (pCV-A9, pCV-A16, pCV-A21, pCV-B3, pCV-B4 ja pE-7). Kuvasta 4 voidaan nähdä, että qPCR-reaktiosarjoista SensiFAST tuotti kirkkaammat bandit geelille kuin KAPA. KAPA qPCR-reaktiosarja osoittautui kuitenkin herkemmäksi varsinaisissa qPCR-ajoissa.



Kuva 4. PCR-gradienttitesti.

(A) pCV-A9-virus-plasmidilla tehty lämpötilagradientti 45-52 °C (SensiFAST; ylempi ja KAPA; alempi). (B) pCV-A16: lämpötilagradientti 45-55 °C (SensiFAST; ylempi ja KAPA; alempi). (C) pCV-A21: lämpötilagradientti 55-45 °C SensiFAST; ylempi ja KAPA; alempi). (D) pCV-B3: lämpötilagradientti 60-50 °C KAPA-reaktiosarjalla. (E) pCV-B4: lämpötilagradientti 60-50 °C KAPA-reaktiosarjalla.

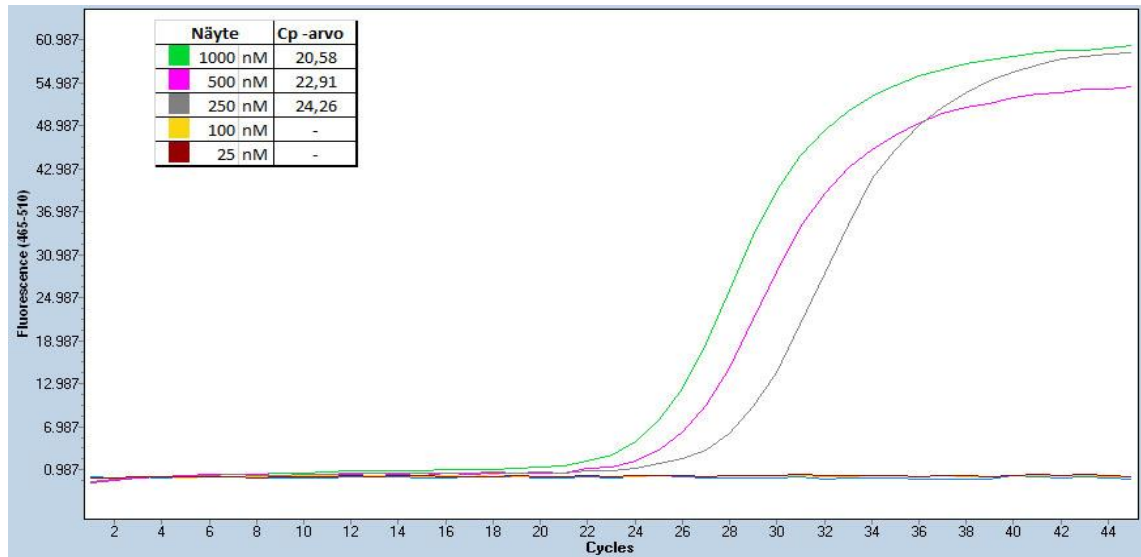
Työn seuraavassa vaiheessa testattiin menetelmän käytettävyyttä qPCR-ympäristössä sekä neljän eri qPCR-reaktiosarjan (KAPA, SensiFAST, Maxima ja Brilliant III) herkkyyttä virus-plasmidien laimennossarjoilla 10^6 - 10^{-1} . Tässä vaiheessa vaihdettiin AN89-alue VP1-T7-AN89-alukkeeseen, jossa on AN89-alueen lisäksi T7-sekvenssi 5'-päässä – tätä voidaan käyttää hyväksi näytteitä sekvensoitaessa. VP1-T7-AN89-alue tuotti huomattavasti herkempiä tuloksia ja sitä käytettiin jatkossa tässä työssä.



Kuvio 1. qPCR-testi pCV-A9-virusplasmidilla.

Saaduista tuloksista (Kuvio 1) voidaan todeta, että KAPA-reaktiosarja on selkeästi herkin qPCR-reaktiosarja, joten tätä käytettiin jatkossa. Vaikka SensiFAST näytti alussa olevan selkeästi parempi agaroosigeelijaissa, KAPA voitti sen herkkyydessä. KAPA:n herkkyydeksi virusplasmidilla saatiin näiden testien perusteella 10^2 eli 100 viruskopiota / μ l.

Työssä testattiin myös tarvitaanko tuotteen muodostamiseen ohjeistuksen mukaista määrää 500 nM AN88- ja AN89-alukkeita vai riittääkö vähempi määrä. AN-alukkeet ovat ns. wobble-primereita eli alukeseoksia, joten todellinen konsentraatio spesifiselle alukkeelle on alhaisempi kuin ilmoitettu konsentraatio. Testissä käytettiin taulukon 4 mukaista reaktioseosta, jonka alukekonsentraatioita muunneltiin. Käytetyt konsentraatiot olivat 1000 nM, 500 nM, 250 nM, 100 nM ja 25 nM.



Kuva 5. Alukelaimennostesti.
Alukekonsentraation vaikutus Cp-arvoon.

Tämän jälkeen siirryttiin RT-qPCR-menetelmään, jossa vertailtiin eri RT-entsyymien toimintaa ja herkkyyttä. RT-qPCR-ajoissa käytettävän RT-reaktioseoksen ja PCR-reaktioseoksen koostumus on esitetty taulukoissa 6 ja 7.

Taulukko 6. RT-reaktioseos.

Reagenssi	Määrä (µl) (loppukonsentraatio)
5X – puskuri	2 (1X)
25 mM MgCl ₂	1 (2,5 mM)
10 mM dNTP	0,5 (0,5 mM)
RNAasi-inhibiittori	0,5
RT-entsyymi	0,5
T7-AN89-aluke	1 (µM)
Virus-RNA	4,5
Kokonaistilavuus	10

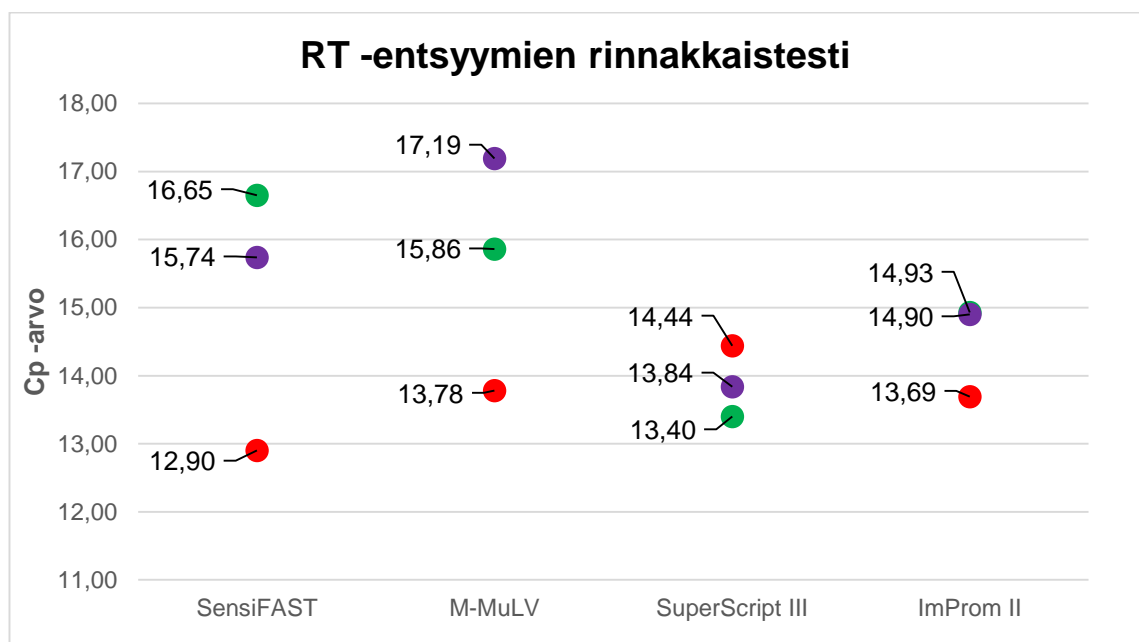
RT-reaktio: Inkubaatio 42 °C:ssa 1 h ± 15 min.

Taulukko 7. PCR-reaktioseos.

Reagenssi	Määrä (µl) (loppukonsentraatio)
H ₂ O	7
AN88-aluke	0,5 (0,5 nM)
T7-AN89-aluke	0,5 (0,5 nM)
qPCR-reaktiosarja	10
cDNA/Templaatti	2
Kokonaistilavuus	20

Aluksi vertailtiin neljää eri RT-entsyymiä (SuperScript III, SensiFAST, M-MuLV ja ImProm II) myöhemmin mukaan tuli kaksi muuta RT-entsyymiä (SuperScript IV, AffinityScript).

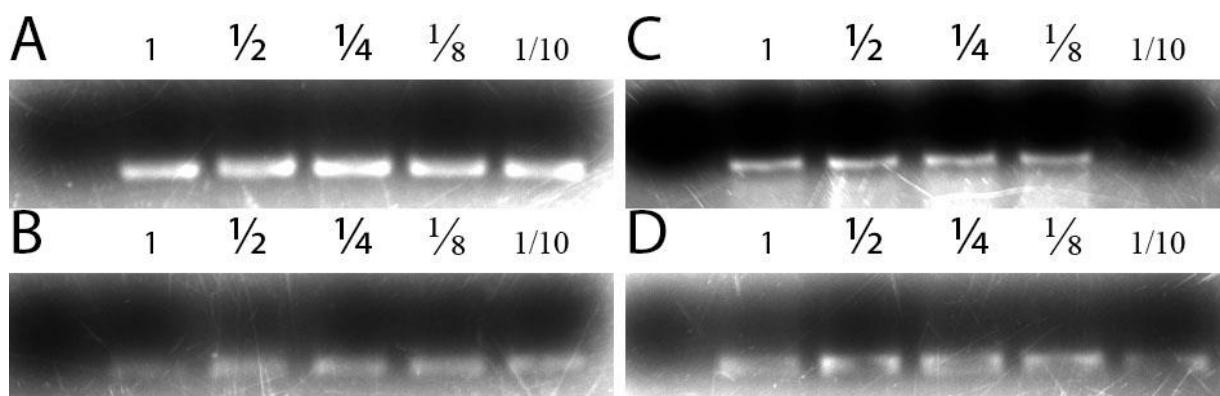
Ensimmäisenä testattiin neljän RT-entsyymin (SuperScript III, SensiFAST, M-MuLV ja ImProm II) kanssa rinnakkaisnäytteiden hajontaa ajamalla kolme rinnakkaista näytettä kullakin RT-entsyymillä valmistetuilla näytteillä.



Kuvio 2. RT-entsyymien rinnakkaistesti.

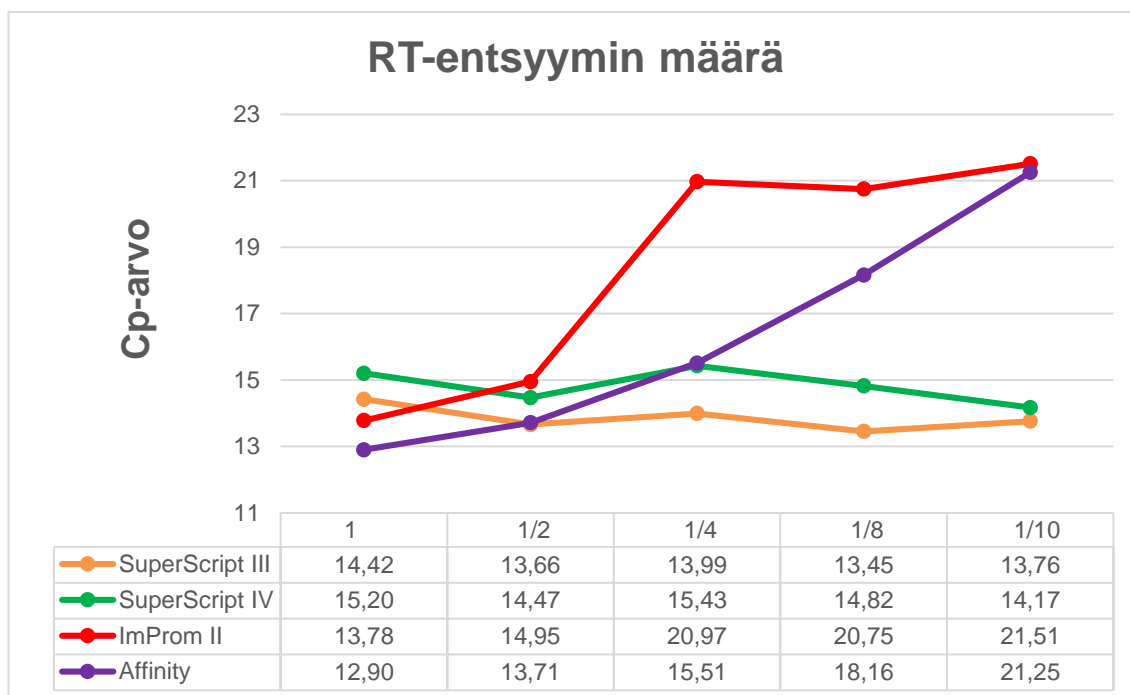
Kuten kuviosta 2 voidaan huomata SensiFAST ($\sigma = 1,60$) ja M-MuLV ($\sigma = 1,40$) -entsyymeillä valmistettujen näytteiden keskihajonta Cp-arvoissa on huomattavasti suurempi kuin SuperScript III:lla ($\sigma = 0,43$) ja ImProm II:lla ($\sigma = 0,58$). Hajonta johtunee ensisijaisesti pipetointitarkkuudesta, mutta voi myös olla RT-entsyymien ominaisuus. SuperScript III ja ImProm II osoittautuivat herkemmiksi RT-entsyymeiksi kuin SensiFAST ja M-MuLV. Tämän perusteella luovuttiin SensiFAST ja M-MuLV -entsyymien käytöstä.

Seuraavaksi tutkittiin, mikä määrä RT-entsyymiä riittää reaktion onnistumiseen. Testissä käytettiin taulukon 6 mukaista RT-reaktioseosta, jossa muutettiin RT-entsyymien määrää. Testissä käytettiin neljää RT-entsyymiä (SuperScript III, SuperScript IV, ImProm II ja AffinityScript). Käytettävät laimennokset ovat 1 (ohjeen mukainen määrä), 1/2, 1/4, 1/8 ja 1/10.



Kuva 6. RT-entsyymien määrää mittaava testi.

A) SuperScript III, B) SuperScript IV, C) AffinityScript ja D) ImProm II



Kuvio 3. RT-entsyymin määrää mittaava testi.

Kuten kuviosta 3 voidaan havaita Cp-arvot pysyvät jokseenkin samoina kaikilla entsyymeillä vielä 1/2-laimennoksessa. 1/4-laimennoksessa havaitaan jo suurempia muutoksia etenkin ImProm II-entsyymin kohdalla. Tästä voidaan päätellä, että RT-entsyymiä voidaan huoletta käyttää puolet ohjeistusta vähemmän ilman, että tuotteen muodostumisessa tapahtuu mitään kriittistä muutosta. Kuvasta 6 nähdään agarosigeelille ajettuja näytteitä, joista nähdään mikä entsyymi tuottaa milläkin laimennoksella oikeankokoisen bandin geelille. Kuvasta nähdään selkeästi, että SuperScript III ja ImProm -entsyymit tuottavat kaikilla laimennoksilla oikeankokoista tuotetta.

Tämän jälkeen testattiin RT-entsyymien herkkyttä verraten niitä ENRI-menetelmään. Samaa näytettä monistettiin sekä ENRI-menetelmällä (120 bp pala genomin 5'-päästä) että VP1-menetelmällä käyttäen kolmea eri RT-entsyymiä ja VP1-aluetta). Taulukoiden 6 ja 7 mukaiset reaktioseokset pipetoiitiin käyttäen eri RT-entsyymejä (SuperScript III, SuperScript IV ja ImProm II) ja taulukoiden 8 ja 9 mukaiset ENRI-reaktioseokset käyttäen RT-entsyyminä SuperScript III:sta.

Taulukko 8. ENRI RT -reaktioseos.

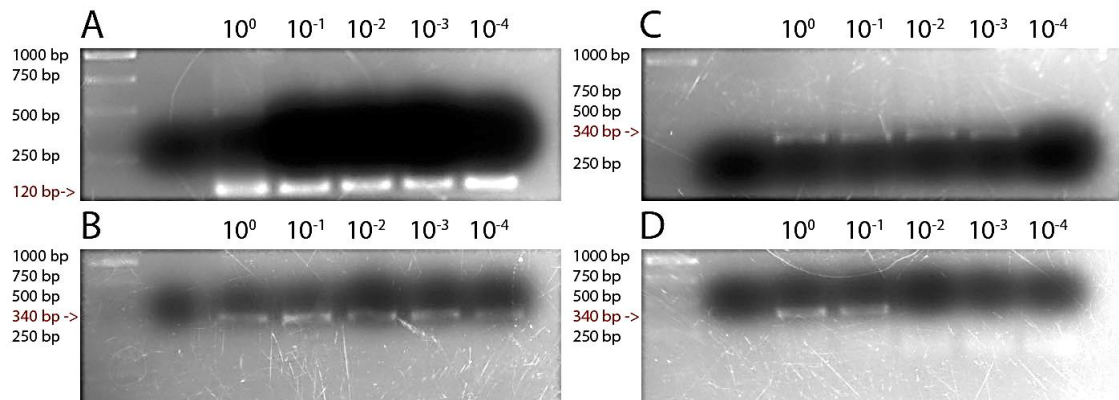
Reagenssi	Tilavuus (µl)
H ₂ O	8,9
5x puskuri	8
dNTP	8
ENRI 4- -aluke	4,9
RNAasi inhibiittori	0,1
RT-entsyymi	0,1
virus-RNA	10
Lopputilavuus	40

RT-reaktio: Inkubaatio 42 °C:ssa 1 h ± 15 min.

Taulukko 9. ENRI PCR -reaktioseos.

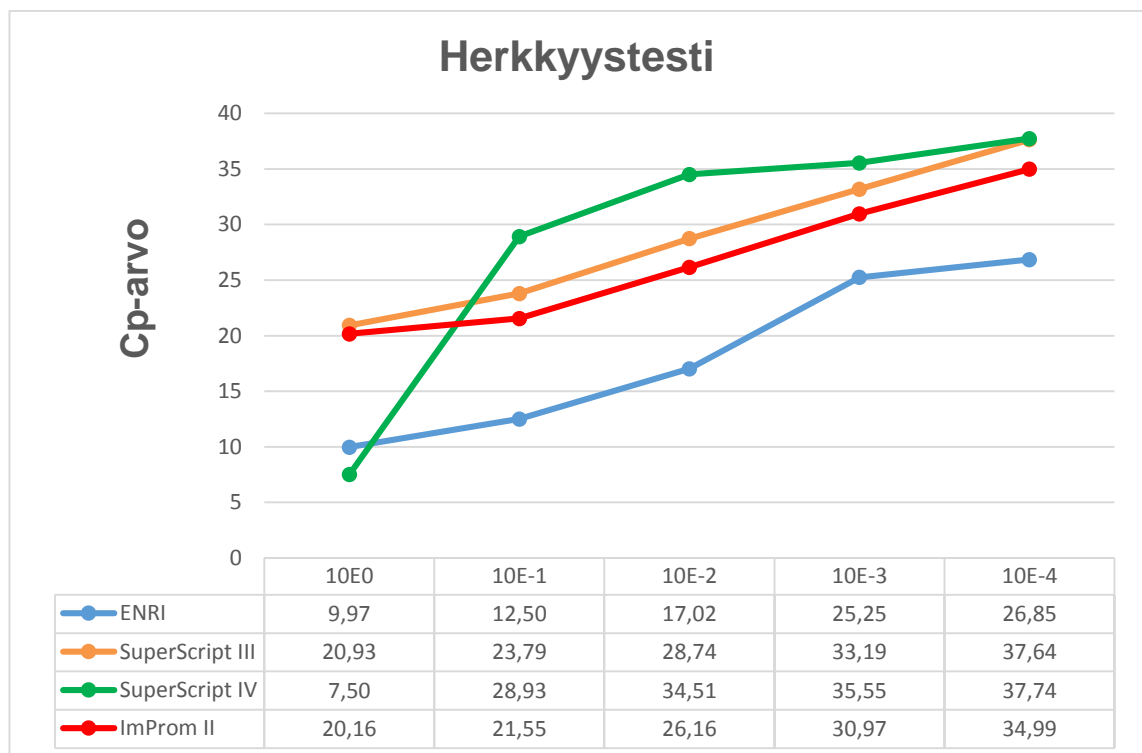
Reagenssi	Tilavuus (µl)
H ₂ O	4,5
ENRI 4-	1,5
ENRI 3+	1,5
qPCR-reaktiosarja	12,5
cDNA/Templaatti	5
Lopputilavuus	25

Herkkyyttä testattiin laimentamalla RT-vaiheessa tuotettua cDNA:ta seuraavasti: 10⁰ (laimentamaton näyte), 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ ja 10⁻⁴. DNA-näytteet laimennettiin RNA-vapaaseen veteen.



Kuva 7. RT-qPCR-herkkyystesti.

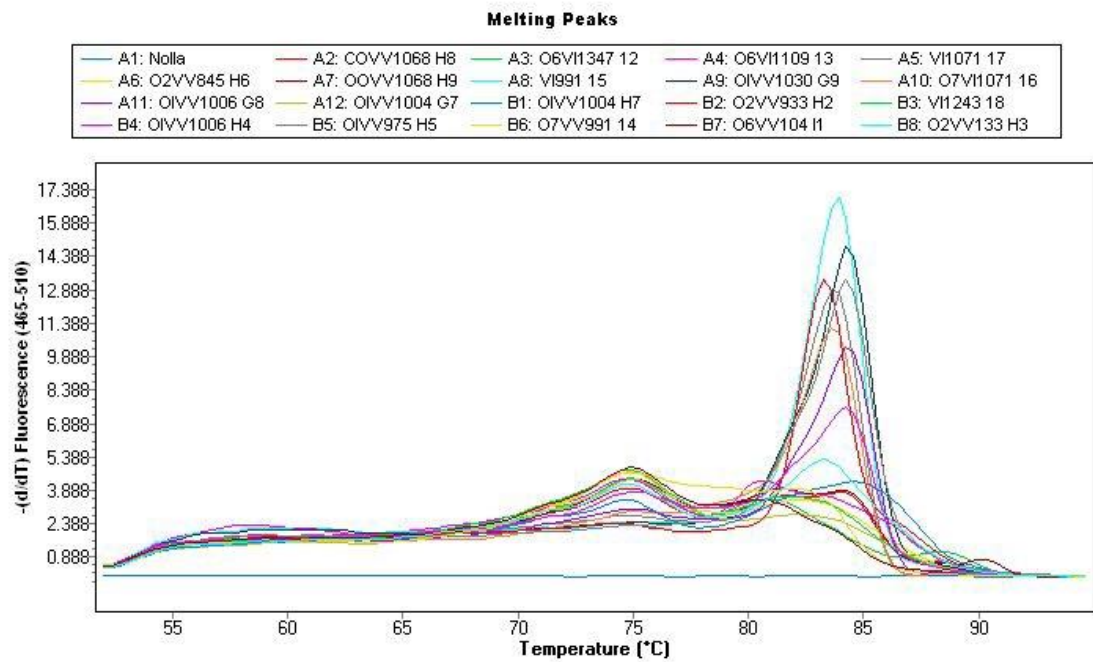
A) ENRI, B) ImProm II, C) SuperScript III ja D) SuperScript IV.



Kuvio 4. RT-qPCR-herkkyystesti.

Kuvaa 7 ja kuviota 3 vertailemalla nähdään, että SuperScript III ja ImProm II -entsyymeillä saatiin herkimmät tulokset verrattuna ENRI:in.

Työvaiheen lopuksi testien tulokset analysoitiin ja niistä muodostettiin optimoitu RT-qPCR-menetelmä, jolla ajettiin 19 kappaletta tuntemattomia enterovirusta sisältäviä RNA-näytteitä (Kuva 8).



Kuva 8. RNA-näytteiden sulamispisteet.

Jokaiselle DNA:lle ominaisen sulamispisteen perusteella voidaan tunnistaa, mitä virusgenomia näytteessä on. Kuten kuvasta 8 voidaan havaita, että 9/19 näytteistä tuottaa sulamiskäyrän niille ominaisessa lämpötilassa (83-86 °C).

6 POHDINTA

Työn tavoitteena oli luoda optimoitu ja tarkka menetelmä enterovirusten tunnistamiseksi. Eri parametreja ja reagensseja testailemalla saavutettiin menetelmä, jota testattiin käyttämällä tuntemattomia enterovirus-RNA-näytteitä.

Tutkimuksen aikana tutkittiin kiinnittymislämpötilan vaikutusta tuotteen muodostumiseen, eri qPCR-reaktiosarjojen herkkyyttä ja toimivuutta sekä eri RT-entsyymien herkkyyttä. Työssä havaittiin huomattavia eroja eri valmistajien qPCR-reaktiosarjojen välillä niin herkkyydessä kuin yleisessä toimivuudessa qPCR-ympäristössä. RT-entsyymien suhteen tilanne ei ollut yhtä selkeä, koska SuperScript III ja ImProm II -entsyymit vaikuttivat loppujen lopuksi yhtä hyviltä, mutta vaihtelua havaittiin etenkin entsyymien määrän testailussa. Yksi tärkeimmistä huomioista oli se, ettei uusi ja erittäin herkäksi luvattu reagenssi (SuperScript IV) välttämättä oikeasti ole sen herkempi kuin vanhempi, markkinoilla kauemmin ollut reagenssi (SuperScript III). Työn tärkein tulos oli se, että 340 bp geenialuetta pystyttiin monistamaan qPCR-menetelmällä, mitä ei aiemmin ole kirjallisuudessa osoitettu.

Lopputuloksena saatiin toimiva RT-qPCR-menetelmä, jolla pystyttiin tunnistamaan tunnettuja enterovirus-RNA-näytteitä sekä 9/19 tuntemattomista näytteistä. Se, että testillä ei kyetty monistamaan kaikkia tuntemattomia enterovirus-RNA-näytteitä voi selittyä sillä, ettei menetelmä ole täysin optimaalinen kaikille enterovirustyypeille. On myös mahdollista, että käytetyt alukkeet eivät toimi näillä virusnäytteillä, koska alkuperäisessä julkaisussa alukkeita on käytetty vain prototyyppikannoilla, joiden sekvenssi saattaa erota kliinisistä virustyypeistä. Testeissä käytetyt virusplasmidit ja RNA-näytteet edustivat suurimmaksi osaksi *Enterovirus B* -lajin enteroviruksia, joille menetelmä näytti toimivan. Tämän selvittämiseksi olisi syytä testata useampia eri qPCR-reaktiosarjoja ja RT-entsyymejä, jotta voidaan sanoa vielä varmemmin menetelmän optimaalisuus. Lisäksi voidaan kehittää uusia alukkeita tai alukeseoksia, jotka monistaisivat eri aluetta tai erikokoista aluetta viruksen genomissa.

LÄHTEET

- ¹ Nix W. A., Oberste M. S., Pallansch M. A. 2006. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical Specimens. *The Journal of Clinical Microbiology* Vol. 44 No. 8, 2698–2704.
- ² Lönnrot M., Sjöroos M., Salminen K., Maaronen M., Hyypiä T., Hyöty H. 1999. Diagnosis of Enterovirus and Rhinovirus Infections by RT-PCR and Time-Resolved Fluorometry with Lanthanide Chelate Labeled Probes. *The Journal of Medical Virology* Vol. 59, 378–384.
- ³ Picornaviridae.com. 2015. The home of Picornaviruses. The Pirbright Institute, UK. Viitattu 22.4.2015. <http://www.picornaviridae.com>.
- ⁴ McWilliam Leitch, E.C., Harvala, H., Ubillos, I., Templeton, K., Simmonds, P. 2008. Direct Identification of human enterovirus serotypes in cerebrospinal fluid by amplification and Sequencing of the VP1 region. *The Journal of Clinical Virology* Vol. 44 No. 2, 119–124.
- ⁵ Lin, H-C., Wang, C-H., Tsai, F-J., Hwang, K-P., Chen, W., Lin, C-C., Li, T-C. 2014. Enterovirus infection is associated with an increased risk of childhood type 1 diabetes in Taiwan: a nation-wide population-based cohort study. *Diabetologia* January 2015, Volume 58, Issue 1, pp 79–86.
- ⁶ ViralZone. 2015. SIB Swiss Institute of Bioinformatics. Viitattu 22.4.2015. http://viralzone.expasy.org/all_by_species/97.html
- ⁷ McMinn, P.C. 2002. An overview of the evolution of enterovirus 71 and its clinical and public health significance. *FEMS Microbiology Reviews* 26 (2002) 91–107.
- ⁸ Gilbert S. F. 2013. *Developmental Biology*. 10. p. United States. Sinauer Associates.
- ⁹ Biology 1510 Biological Principles. 2011. Recombinant DNA. Referenced in 13.4.2015. <http://bio1510.biology.gatech.edu/module-5-integrative-health/01-recombinant-dna/>.
- ¹⁰ Max Planck institute for developmental biology. 2015. mRNA degradation. Referenced in 13.4.2015. <http://www.eb.tuebingen.mpg.de/research/research-groups/remco-sprangers/mrna-degradation.html>.
- ¹¹ PCR applications manual. 2006. 3. p. Germany. Roche Diagnostics.
- ¹² LightCycler® 480 Instrument Addendum 1 to Operator's Manual. 2008. Germany. Roche Diagnostics.
- ¹³ LightCycler 480 Real-Time PCR instrument – käyttöohjeet suomeksi SYBR Green ja UPL – kemioille. Roche Applied Science – team. Espoo. Roche Diagnostics Oy.
- ¹⁴ Real-time PCR: Understanding Ct. 2011. United States. Applied Biosystems by Life technologies. Viitattu 22.4.2015. http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_053906.pdf